

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 06 April 2001 (06.04.01)	
International application No. PCT/EP99/05234	Applicant's or agent's file reference P 50133
International filing date (day/month/year) 22 July 1999 (22.07.99)	Priority date (day/month/year)
Applicant KRUPP, Guido et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 13 February 2001 (13.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Claudio Borton
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 12 OCT 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

WIPO PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 50133	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05234	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/07/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE et al		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 13/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 09.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Knudsen, H Tel. Nr. +49 89 2399 8696 



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-27 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-40 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

25-27, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung, Seiten:



- ☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
 - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- ☐ erfüllt ist
 - ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
- ☒ alle Teile.
 - ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung



1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-40
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-40
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-40
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Der unabhängige Anspruch 1 und der unabhängige Anspruch 19 haben keine technischen Merkmale gemeinsam. Die Ziele der Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 19 sind auch unterschiedlich. Der Anspruch 1 betrifft ein Verfahren zum spezies-spezifischen Nachweis, und Anspruch 19 betrifft ein Verfahren zur Aufkonzentrierung von Bakterien. Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 19 ist daher nicht einheitlich im Sinne von Regel 13 PCT.

Der Anmelder argumentiert, daß das Aufkonzentrierungsverfahren gemäß Anspruch 19 eine notwendige Vorbehandlung einer Probe darstellt und deswegen erfinderisch mit dem Verfahren gemäß Anspruch 1 verbunden ist. Die Prüfungsbehörde kann diese Argumentation nicht folgen, weil die Ansprüche 1 und 19 einzelne unabhängige Ansprüche sind, die auch mit anderen Vorbehandlungs- bzw. Nachweisreaktionen durchgeführt werden können.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- 5.1 WO 98/20166 (D1) beschreibt ein Verfahren zur DNA Diagnose, das auf der Anwendung massenspektrometrischer Verfahren beruht. In diesem Verfahren wird eine spezifische Nukleinsäuresequenz in der Probe amplifiziert und danach mit einem Primer, der in einer Reaktion mit drei dNTPs und einem ddNTP verlängert wird, kontaktiert. Die verschiedenen Elongate werden mittels Massenspektrometrie ausgewertet (siehe das auf den Seiten 12-13 beschriebene Verfahren). Das Verfahren kann durch die Anwendung der Unterschiede bekannter Sequenzen zur Bestimmung einer Infektion in einer biologischen Probe eingesetzt werden (siehe Seiten 73-75).

Die Ansprüche 1 und 3*-7 unterscheiden sich daher von D1 nur darin, daß konservierte Sequenzen amplifiziert werden.



5.2 WO 97/41259 (D2) beschreibt die Anwendung einer kombinierten Amplifizierungs- und Sequenzierungsreaktion zur Diagnose einer Infektion in einer natürlichen biologischen Probe (z.B. C.trachomatis in menschlichem Blut). Die Anwendung von Primern, die eine konservierte Region amplifizieren, wird vorgeschlagen (S.9, Z.21). Die Sequenzierungsreaktion unterscheidet sich von der im Anspruch 1 erwähnten Reaktion, darin daß PCR und Kettenabbruchsreaktion gleichzeitig durchgeführt werden.

5.3 Für den Fachmann, der Kenntnis zu D1 und D2 hat, und wie in D2 eine Sequenzierungsreaktion zur Bestimmung einer Spezies einsetzen möchte, wäre es daher naheliegend eine konservierte Sequenz zu amplifizieren und mit der in D1 beschriebene Sequenzierungsreaktion zu analysieren. Anspruch 1 scheint daher nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen. Dasselbe gilt für die abhängigen Ansprüche 3*-7.

Der Anmelder ist der Auffassung, daß die Anwendung von konservierten Sequenzen eine Reihe von technischen Problemen löst und deswegen erfinderisch sei. Die gelösten Probleme sind:

daß eine überraschend hohe Zahl von Proben untersucht werden können;

daß im Zusatz zur spezifischen Spezies auch unbekannte Mikroorganismen detektiert werden können; und

daß eine Vielzahl von Mikroorganismen gleichzeitig nachgewiesen werden könne.

Die Prüfungsbehörde findet, daß die für die Lösung dieser Probleme nötigen Merkmale im Anspruch 1 nicht vorhanden ist. Der Nachweis von mehreren Mikroorganismen basiert eindeutig auf eine besondere Wahl einer konservierten Sequenz. Die in der Anmeldung gegebene Definition einer konservierten Sequenz besagt nur, daß die Sequenz bei den nachzuweisenden Spezies eine große Homologie aufweisen muß. Dies führt daher nicht zur Detektion von unbekannten oder mehreren Mikroorganismen. Was die hohe Zahl von Proben angeht, ist es überhaupt nicht klar, wie dieses Problem gelöst wird.



- 5.4 Aus "Nucleic acid techniques in bacterial systematics, p. 115-175, D.J. Lane, (1991), JOHN WILEY AND SONS" (D3) geht jedoch hervor, daß viele ribosomale 16S und 23S Sequenzen bekannt sind u.a. die Primer gemäß SEQ ID NOs 1-2 und 5-9, und für die spezies-spezifische Bestimmung von Mikroorganismen sehr gut geeignet sind. Es wäre daher für den Fachmann naheliegend, die ribosomalen 16S und 23S Sequenzen als konservierte Sequenzen in dem Verfahren gemäß D2 einzusetzen. Die Anwendung von Primern aus der rRNA-Spacer Region in der Diagnostik ist auch in DE-A-198 01 661 (D4) beschrieben. Die Ansprüche 8-11 und 18 sind daher nicht erfinderisch.
- 5.5 Die abhängigen Ansprüche 2-3, 12 und 14-17 scheinen keine Merkmale zu enthalten, die zur Zeit als erfinderisch angesehen werden könnten.
- 5.6 EP-A-0 096 674 (D5) beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von Bakterien im Blut worin die Probe in einer Reaktionslösung mit 0.1 % Triton®X-100 10 Minuten inkubiert wird, die vorbehandelte Probe wird danach 20 Minuten bei 400 g zentrifugiert und mit einer Flüssigkeit mit einer Dichte zwischen 1.02 und 1.14 g/ml überlagert. Das bakterielle Band kann danach ausgeschnitten werden und für weitere Analysen verwendet werden.
- 5.7 Das Verfahren gemäß Anspruch 19 unterscheidet sich gegenüber D5 nur darin, daß eine höhere Konzentration von Triton® eingesetzt, und daß eine höhere Zentrifugalkraft verwendet wird. Die Anwendung größerer Zentrifugalkräfte und höherer Konzentrationen eines Reagenzes scheint für den Fachmann naheliegende Alternativen zu sein und eine erfinderische Tätigkeit für Anspruch 19 könnte daher nur anerkannt werden, wenn der Anmelder in einem Vergleichsversuch zeigen würde, daß eine verbesserte Aufkonzentrierung der Bakterien mit dem beanspruchten Verfahren möglich ist. Dies ist besonders erforderlich, weil EP-A- 745 849 (D6) beschreibt, daß bei Konzentrationen höher als 0.2 % Triton® X-100 eine Lyse der Bakterien stattfindet.
- 5.8 Die abhängigen Ansprüche 20-23 scheinen z.Z. auch nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.



- 5.9 Das Verfahren gemäß Anspruch 24 besteht in der Kombination des Verfahrens gemäß Anspruch 19 mit dem gemäß Anspruch 1. Die Kombination zweier nicht erfinderischen Verfahren wird jedoch in der Abwesenheit unerwarteter Effekte nicht als erfinderisch angesehen.
- 5.10 Das Kit gemäß den Ansprüchen 25-29 ist nicht erfinderisch aus denselben Gründen wie die entsprechenden Verfahrensansprüche.
- 5.11 Dasselbe trifft für das Kit gemäß den Ansprüchen 30-40 zu.
- 5.12 Die Gegenstände der Ansprüche 1-40 werden als gewerblich anwendbar angesehen.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Der in Anspruch 1 verwendeter Begriff "konservierte Sequenzen" ist vage und daher nicht für die Definition eines Anspruchsgegenstandes geeignet. Dieser Einwand kann in Zusammenhang mit dem unter # 5.3 erhobenen Einwand gelesen werden.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 01/07648 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (74) Anwälte: WEBER-QUITZAU, Martin usw.; Uexküll & Stolberg, Beselerstrasse 4, D-22607 Hamburg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05234 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Juli 1999 (22.07.1999)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK UND ENTWICKLUNG MBH [DE/DE]; Gerstäckerstrasse 9, D-20459 Hamburg (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRUPP, Guido [DE/DE]; Wannseebogen 30A, D-24111 Kiel (DE). SCHEINERT, Peter [DE/DE]; Övelgönner Strasse 25, D-20257 Hamburg (DE). SÖLLER, Rainer [DE/DE]; Lesmonastrasse 18, D-28717 Bremen (DE). SPENGLER, Ulrich [DE/DE]; Bahnenfelder Kirchenweg 25, D-22761 Hamburg (DE).
- Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 01/07648 A1

(54) Title: METHOD FOR THE SPECIES-SPECIFIC DETECTION OF ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SPEZIESSPEZIFISCHEN NACHWEIS VON ORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the species-specific detection of prokaryotes and eucaryotes, and to kits for implementing said method. The invention also relates to a method for species-specific detection of sepsis inducers.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Prokaryonten und Eukaryonten sowie Kits zur Durchführung dieser Verfahren. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Sepsiserregern.



Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Organismen

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Prokaryonten und Eukaryonten sowie Kits zur Durchführung dieser Verfahren. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Sepsiserregern.

Der zuverlässige Nachweis verschiedenster Organismen, insbesondere von Mikroorganismen wie Bakterien, spielt eine zunehmende Rolle in der medizinischen Mikrobiologie und ist häufig Voraussetzung für die gezielte Behandlung von Infektionen bei Mensch und Tier. In diesem Zusammenhang haben Gürtler et al. (Microbiology 142 (1996) 3-16) und Scheinert et al., J. Microbiol. Methods 26 (1996) 103-117) die Verwendung der 16S-23S rDNA bzw. rRNA Spacer-Region zur Typisierung und Identifikation von Bakterien vorgeschlagen. Die Sequenzen von rRNAs werden bislang am häufigsten zur Identifikation von Mikroorganismen benutzt. Im Genom von prokaryontischen und eukaryontischen Organismen sind die Operons für ribosomale RNAs (rRNAs) so organisiert, daß

zunächst eine umfassende Vorläufer-rRNA transkribiert wird. Diese Vorläufer-rRNAs enthalten im wesentlichen folgende Komponenten in 5'-3'-Richtung:

5 Prokaryonten - ribosomale DNA umfaßt Sequenzen für:

5' - 16S rRNA - transkribierter 16S/23S rRNA-Spacer - 23S rRNA - transkribierter 23S/5S rRNA-Spacer - 5S rRNA - 3'

10 Eukaryonten - ribosomale DNA umfaßt Sequenzen für:

5' - 18S rRNA - transkribierter 18S/5.8S rRNA-Spacer (ITS1) - 5.8S rRNA - transkribierter 5.8S/28S rRNA-Spacer (ITS2) - 28S rRNA - 3'.

15

Diese generelle Organisation ist bei allen Prokaryonten (*Bacteria* und *Archaea*) und Eukaryonten vorhanden (vgl. z.B. B. Lewin, Genes V, Cell Press, Cambridge, Massachusetts/USA, 1994), wobei bislang nur sehr wenige Ausnahmen, wie z.B. das *Archaeon Thermoplasma acidophilum* (Achenbach-Richter et al., System. Appl. Microbiol. 10 (1988) 211-214) oder *Helicobacter* (Tomb et al., Nature 388 (1997) 539-547) bekannt sind.

25 Es hat sich herausgestellt, daß die Längen der rRNA-Spacer extrem variabel sind und innerhalb einer gut definierten Gruppe von Mikroorganismen, wie z.B. Mycoplasmen, allein die Länge ein geeignetes Mittel zur Einordnung von Mikroorganismen in diese Gruppe (z.B. Mycoplasmen) ist und zum Teil auch zur Identifizierung einzelner Spezies innerhalb dieser Gruppe herangezogen
30 werden kann.

Bei den von Gürtler et al. (a.a.O.) und Scheinert et al. (a.a.O.) beschriebenen Verfahren zur Typisierung und Identifizierung von Bakterien unter Verwendung der 16S-23S rDNA bzw.
35 rRNA Spacer-Region wird unter Verwendung geeigneter Primer zunächst eine Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR-

Amplifikation) durchgeführt. Die amplifizierten Spacer können anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch geeignete Detektionsverfahren, wie z.B. Färbung mit Ethidiumbromid oder Silber oder durch Fluoreszenzdetektion, nachgewiesen werden. Die
5 Lage der Banden, d.h. die Länge der amplifizierten Spacer, erlaubt einen vorläufigen Rückschluß auf den jeweils nachgewiesenen Mikroorganismus bzw. die jeweilige Mikroorganismen-Gruppe.

Für einen sicheren Nachweis, insbesondere zur Erkennung einzel-
10 ner Spezies, ist in der Regel eine sekundäre Längenunterscheidung nach definierter restriktionsenzymatischer Behandlung der amplifizierten Spacer erforderlich. Die einzelnen Spezies innerhalb einer Mikroorganismen-Gruppe ergeben nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Hybridisierung mit Spezies-spezifischen
15 Oligonukleotidsonden ein charakteristisches Bandenmuster.

Diese Methoden weisen den Nachteil auf, daß zum Spezies-spezifischen Erreger-Nachweis eine genaue Kenntnis über die jeweils zu erwartenden Bandenmuster erforderlich ist und darüber hinaus
20 eine extrem große Zahl spezifischer Oligonukleotidsonden zur Verfügung stehen muß. Die bislang im Stand der Technik bekannten Methoden eignen sich daher nicht zum routinemäßigen Erreger-Nachweis in medizinischen Labors.

25 Im Hinblick auf die Sepsis, eine schwere, akut verlaufende Infektionserkrankung, die durch bestimmte Bakterien hervorgerufen wird, die in den Blutkreislauf gelangt sind, stellt sich ferner das zusätzliche Problem, daß diese Bakterien von einem lokal entzündlichen Herd ausgehen und über den Blut- oder Lymphweg in
30 Schüben ausgestreut werden. Aufgrund dieser zyklischen Schwankung sind zum bakteriellen Nachweis bei Sepsis relativ große Mengen Blut erforderlich (jeweils ca. 5 bis 10 ml für aerobe und anaerobe Blutkultur). Dieses große Probenvolumen ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden Mitteln und Methoden nur mit
35 großem Aufwand handhabbar, da größere Kontaminationen mit Fremd-DNA (d.h. nicht-bakterieller DNA) zu einer unspezifischen Auf-

reinigung und damit zur Verringerung der Spezifität einer nachfolgenden PCR führt. Die große Zahl roter Blutkörperchen kann ferner inhibitorisch auf die PCR wirken, und größere Probenvolumina sind für kommerziell erhältliche Kits in der Regel nicht geeignet, da es häufig zur Verstopfung der zur Aufreinigung verwendeten Säulen kommt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zum Nachweis von Organismen (Prokaryonten und Eukaryonten), z.B. in ausgewählten biologischen Proben, zur Verfügung zu stellen, das einfach handhabbar ist und sich für den routinemäßigen Einsatz in medizinischen Labors eignet. Das Verfahren soll ferner eine hohe Spezifität gegenüber einer sehr großen Zahl von Erreger-Gruppen aufweisen, wobei eine Unterscheidung einzelner Spezies innerhalb dieser Gruppen auf einfache, experimentell unaufwendige und kostengünstige Weise möglich sein soll. Schließlich ist es Aufgabe der Erfindung, ein einfaches Verfahren zur Verfügung zu stellen, das den Nachweis von nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Mikroorganismen ermöglicht, wie es z.B. zeitweise im zyklischen Verlauf der Sepsis der Fall ist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 17 und 19 bis 24 und Kits nach den Ansprüchen 25 bis 40 gelöst.

25

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zum spezies-spezifischen Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten mit Hilfe von Nukleinsäure-Amplifikationstechniken, bei dem man zunächst gegebenenfalls eine Anreicherung, Aufkonzentrierung und/oder Vermehrung der nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten in einer biologischen Probe vornimmt und/oder die in der biologischen Probe vorhandene DNA isoliert und/oder anreichert. Die Amplifikation der DNA erfolgt mit Hilfe einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (NAT), bei der man unter Verwendung von Amplifikationsprimern, die die für die betreffenden Organismen konservierten Sequenzen enthalten, einen Bereich der DNA ampli-

35

fiziert, der durch die konservierten Sequenzen flankiert ist.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens können beliebige, dem Fachmann geläufige Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) eingesetzt werden, vorzugsweise eine NAT aus der Gruppe bestehend aus PCR, bDNA, LCR, 3SR, SDA oder NASBA.

Zu den (isolierten) Amplifikaten wird im nächsten Schritt ein Sequenzierprimer zugegeben, der mit einem Bereich innerhalb der amplifizierten Sequenzen hybridisiert, der bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist. Der Sequenzierprimer dieser als "Minisequencing" bezeichneten Verfahrensstufe wird dabei so gewählt, daß für die nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongate erhalten werden, wenn man eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt, bei der man 1, 2, oder 3 der vier möglichen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) verwendet oder von den vier möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-Desoxyribonukleosidtriphosphat (Kettenabbruch-NTP) ersetzt. Nach Bestimmung des jeweils erhaltenen Längenzuwachses (Elongate; d.h. Anzahl der Basen, um die die Amplifikate verlängert wurden), den die Produkte der Kettenabbruchpolymerisation gegenüber den Amplifikaten aufweisen, werden diese Werte mit den Elongaten verglichen, die für die jeweiligen Organismen aufgrund ihrer Sequenz zu erwarten sind. Ein bestimmter, in der Probe vorhandener Prokaryot oder Eukaryot wird dadurch nachgewiesen, daß beobachtete (erzielte) Elongation und erwartete Elongation übereinstimmen.

Im Einzelfall kann es vorkommen, daß mehrere der in der Probe vorhandenen Organismen bei Verwendung eines einzigen Sequenzierprimers gleiche Elongate (d.h. denselben Längenzuwachs im Vergleich zu den Amplifikaten) ergeben. Gegebenenfalls verwendet man dann einen oder mehrere weitere Sequenzierprimer, der/die mit einem Bereich/Bereichen innerhalb der amplifizierten Sequenzen hybridisiert/hybridisieren, der/die bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist/konserviert sind,

wobei der/die weitere/weiteren Sequenzierprimer so gewählt ist/-sind, daß für die nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongate erhalten werden, wenn man eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt, bei der man 1, 2, oder
5 3 der vier möglichen dNTPs verwendet oder von den vier möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-NTP ersetzt. Nach Bestimmung des für jeden Sequenzierprimer jeweils erhaltenen Längenzuwachses (Elongate; Anzahl der Basen, um die die Amplifikate verlängert wurden), den die Produkte der Kettenabbruchpolymerisation
10 gegenüber den Amplifikaten aufweisen, werden diese Werte mit den Elongaten verglichen, die für die jeweiligen Organismen aufgrund ihrer Sequenz zu erwarten sind. Ein in der Probe vorhandener Prokaryot oder Eukaryot wird dadurch nachgewiesen, daß die bei Einsatz der verschiedenen Sequenzierprimer experimentell erhal-
15 tenen Elongationswerte (experimentell bestimmtes Elongationsmuster) mit den für diesen Organismus zu erwartende Elongationswerten (erwartetes Elongationsmuster) übereinstimmen.

Zum speziesspezifischen Nachweis von Organismen in biologischen
20 Proben müssen somit genau sovieler verschiedene Sequenzierprimer verwendet werden, bis für alle, möglicherweise in der Probe vorhandenen Organismen unterschiedliche Elongationsmuster erhalten werden. Im Beispielteil ist dies anhand der Bestimmung von Sepsiserregern veranschaulicht.

25 Die bei der Kettenabbruchpolymerisation verwendeten Sequenzierprimer haben vorzugsweise eine Länge von 15 bis 30 Nukleotiden. Als Kettenabbruch-NTPs (chain terminators) kommen z.B. Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs), 3'-O-Methyl-NTPs, 3'-Amino-
30 NTPs und dergleichen in Frage.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung kann das Verfahren bei Verwendung mehrerer Sequenzierprimer durchgeführt werden, indem man bei der Kettenabbruchreaktion von den vier
35 möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-NTP (z.B. ddA) ersetzt, wobei die Polymerisation in gleichzeitiger Gegenwart

aller Sequenzierprimer erfolgt, wobei die Sequenzierprimer jeweils unterschiedliche Markierungen tragen, um die Unterscheidbarkeit der jeweiligen Elongate zu ermöglichen.

- 5 Die Länge der Elongate kann durch dem Fachmann bekannte Methoden bestimmt werden, wie z.B. mit Hilfe elektrophoretischer Methoden, durch massenspektrometrischen Nachweis oder z.B. durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) oder vergleichbare
10 Methoden. In diesem Zusammenhang ist es von Vorteil, vorzugsweise den Sequenzierungsprimer zu markieren. Bei Einsatz mehrerer Sequenzierungsprimer sollten diese, insbesondere bei Durchführung der Polymerisationen in einem einzigen Reaktionsgefäß unter Verwendung von nur einem Terminator (z.B. ddA), unterschiedlich markiert sein. Geeignete Markierungen, wie z.B. Fluoreszenzlabel oder sich in ihrer Masse unterscheidende Markierungen,
15 sind dem Fachmann wohlbekannt.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist man die Primerelongate massenspektroskopisch nach, wobei
20 sich MALDI-TOF-Spektrometrie (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight spectrometry (MALDI-TOF-Spektrometrie), vgl. z.B. Fu et al., Nature Biotechnol. 16 (1998) 381-384)) als besonders vorteilhaft erwiesen hat, die einen Nachweis von bis zu 2000 Nukleotiden oder mehr gestattet.

- 25 Vorteilhaft ist in diesem Zusammenhang die "Multiplex-Analyse", d.h. die simultane Analyse der Elongationsprodukte mehrerer Sequenzierungsprimer mit unterschiedlichen Zielsequenzen. Dazu werden die Elongationsreaktionen mit unterschiedlich markierten
30 Sequenzierungsprimern entweder in einem Reaktionsgefäß unter Verwendung eines einzigen Terminators (Alternative A) oder in verschiedenen Reaktionsgefäßen unter Verwendung unterschiedlicher Terminatoren (Alternative B) durchgeführt, wobei in Alternative B die Produkte der (parallelen) Elongationsreaktionen für
35 die Analyse vereinigt werden. Die notwendige Unterscheidung der Elongationsprodukte ist möglich durch Markierung der Oligonu-

kleotide mit:

(a) unterschiedlich langen 5'-terminalen Zusatzsequenzen, "Tails" (einsetzbar bei allen Nachweisverfahren),

5

(b) unterschiedlichen 5'-terminale Additionen, die Laufverhalten (bei Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder hochauflösender Gelelektrophorese wie Plattengel-, Kapillar- oder Array-Kapillar-Gelelektrophorese) oder Molekulargewicht (MALDI-TOF) drastisch verändern. Beispiele für solche Additionen sind Polyethylenglykol-Kette, Cholesterin-Derivate etc.,

10

(c) unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (bei Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kombiniert mit einem Fluoreszenz-Scanner; routinemäßig bei hochauflösender Gelelektrophorese; prinzipiell auch möglich bei massenspektroskopischer Analyse, wobei durch charakteristische Molekulargewichtswerte und das extrem hohe Auflösungsvermögen auch sich überlagernde Elongationsmuster differenziert werden können).

15

20

Das erfindungsgemäße Verfahren unterliegt prinzipiell keinen methodischen Einschränkungen auf eine bestimmte Organismengruppe. Voraussetzung für die sichere (Wieder-)Erkennung und Organismendifferenzierung ist lediglich, daß die Zielsequenzen (z.B. rRNA, rDNA) der nachzuweisenden Organismen bekannt ist. Das erfindungsgemäße Verfahren der Organismenbestimmung anhand universeller, d.h. in allen Organismen essentiell vorkommenden Sequenzen, (wie z.B. ribosomalen Sequenzen) ist daher zum differenziellen Nachweis definierter Organismengruppen aller Arten von Prokaryonten und Eukaryonten (Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tiere) geeignet.

30

35

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden unter "Prokaryonten"

Vertreter der Gruppe der *Bacteria* und *Archaeae* verstanden und schließen sämtliche, unter diese Gruppen fallenden Spezies mit ein. Der Begriff "Eukaryonten" schließt sowohl ein- als auch mehrzellige Organismen ein, wie z.B. Amöben, Trypanosomen, Plasmodien, Hefen, ein- und mehrzellige Parasiten, sowie Pflanzen und Tiere, wobei sämtliche, unter diese Gruppen fallenden Spezies eingeschlossen sind.

Als Zielsequenzen können im Rahmen der vorliegenden Erfindung im Prinzip alle durch konservierte Bereiche flankierte variable Sequenzen in Betracht kommen, die in allen (nachzuweisenden) Organismen essentiell vorkommen. Beispielsweise ist es möglich, die variablen rDNA-Sequenzen einschließlich rRNA-Spacer als Zielsequenzen auszunutzen. Darüber hinaus kann aber auch von anderen speziesspezifischen Genen oder Genabschnitten ausgegangen werden, wie z.B. vom Cytochrom b-Gen aus Mitochondrien (vgl. Irwin et al., J. Mol. Evol. 32 (1991) 128-144), das zum speziesspezifischen Nachweis von Eukaryonten dienen kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in den unterschiedlichsten Bereichen angewandt werden. Die in den nachfolgenden Anwendungsbeispielen genannten (Mikro-)Organismen stehen jedoch nur stellvertretend für andere Vertreter aus den jeweiligen Organismenreichen (Prokaryota = Bakterien; Eukaryota = ein- und vielzellige Pilze, Pflanzen und Tiere) wie sie in der biologischen Systematik unterschieden werden:

a) Nachweis von Sepsis-Erregern sowie anderen bakterielle Erregern (Pathogenen) bei Mensch, Tier und Pflanzen sowie in Zellkulturen derselben;

b) Nachweis von Einzellern (Protozoen: Flagellaten, Amöben, Sporozoa, Ciliaten) als Verursacher von z.B. Darmerkrankungen bei Mensch und Tier (insbesondere auch Nutztieren);

c) Nachweis von Schädlingen, Kontaminanten, Verderbnis-Erregern

und Pathogenen in der Landwirtschaft, Tierzucht, Lebensmittelindustrie sowie beim Saatgut: hier sind wiederum definierte Organismengruppen aus allen systematischen Gruppen des Lebens (s.o.) differenzierbar und ausdrücklich eingeschlossen, insbesondere aus den Gruppen der Bakterien, Protozoen, Pilze und Artrophoden;

d) Nachweis von Helminthen (Würmer) als Verursacher von Darm-
erkrankungen (z.B. Durchfall);

e) Nachweis von Pilzen als Erreger von Pilzerkrankungen bei
Mensch, Tier und Pflanze;

f) Art-, Rassen- und Herkunftsbestimmung in der Tier- und
Pflanzenzucht, Arterhaltungszucht sowie Landwirtschaft,
Fischerei (z.B. Stichproben bei Überprüfung der Fangquoten)
und bei Lebensmittelkontrollen;

g) Biodiversitäts-Untersuchungen für definierte Gruppen von
Organismen wie z.B. von Süß- oder Salzwasserfischen einschließlich deren Larvenstadien in Europa oder anderen geographisch eingrenzba-
ren Regionen (z.B. zur Bestimmung von Bestandszahlen für Fangquoten u.a.), Bestimmung von Leitorganismen für Gewässergüte oder Bodenbegutachtung.

Insbesondere in der medizinischen Diagnostik kann das Verfahren der vorliegenden Erfindung universell eingesetzt werden, wie z.B. zur Klärung der Frage, welche Erreger(gruppen) vorliegen, wenn ein bestimmtes Krankheitssymptom beobachtet wird. So können beispielsweise die Ursachen für die folgenden medizinisch relevanten Krankheitssymptome mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ermittelt werden:

- Fieber als Folge von bakteriellen (Sepsis), parasitären (z.B. Malaria) oder Pilz-Erregern (z.B. Candida) im Blut;

- 5 - Hirn- oder Hirnhautentzündung, d.h. Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Bewußtseinstörung aufgrund von bakteriellen (Meningokokken, Haemophilus influenza, Pneumokokken, Tuberkelbacillen, E. coli, Listeria monocytogenes), parasitären (z.B. Toxoplasmosis) oder Pilz-Infektionen (z.B. Cryptococcus neoformans);
- 10 - Infektionen des Respirationstrakts, d.h. Husten, Auswurf, Kurzatmigkeit etc. aufgrund von bakteriellen (z.B. Pneumokokken, Chlamydien, Mycoplasmen), parasitären oder Pilz-Infektionen (z.B. Pneumocystis carinii);
- 15 - Infektionen des Auges, d.h. tränendes Auge, unter Umständen Eiter, getrübbtes Sehen etc. Als mögliche Ursache können wiederum eine Reihe von bakteriellen (z.B. Chlamydien, Gonorrhoe, Staphylococcus aureus) oder parasitären Erregern (z.B. Toxoplasma gondii, Onchocerca volvulus etc.) in Betracht kommen;
- 20 - Durchfall und Gewichtsverlust etc. als Folge von bakteriellen (z.B. Salmonellen, Yersinien, Campylobacter, E.coli, Vibrionen, Clostridien, Bacillus), parasitären (z.B. Amöben, Giardien, Cryptosporidien) oder Pilzinfektionen (Candida);
- 25 - Schmerzen bei der Miktion, Hämaturie etc. als Zeichen einer Harnwegsinfektion, z.B. verursacht durch E.coli, Staphylokokken, weitere Enterobacteriaceen wie Proteus mirabilis als bakterielle Erreger, Candida als Pilzvertreter, oder Schistosomen als parasitäre Erreger. Zu dieser Gruppe zählen
30 auch die primär sexuell übertragbaren Erreger, wie z.B. Chlamydien, Gonorrhoe, Syphilis, Mycoplasmen etc.;
- 35 - Infektionen der Haut, d.h. Hautrötungen, Hautjucken, Bläschenbildung etc. Zurückzuführen auf Pilzinfektionen mit Dermatophyten wie z.B. Trichophyton, Epidermophyton und Microsporon, bakterielle Infektionen (z.B. Staphylococcus

aureus oder *Streptococcus pyogenes*) oder parasitäre Erkrankungen, z.B. Leishmanien.

Durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens können Erreger
5 speziesspezifisch nachgewiesen werden, wodurch gezieltere und damit häufig nebenwirkungsärmere Behandlungen ermöglicht werden als im Falle breiter angelegter Therapien.

10 Unter "biologischen Proben" werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle Arten von Proben verstanden, in denen eine begrenzte, wohldefinierte Gruppe nachzuweisender Prokaryonten oder Eukaryonten vorliegen kann. Bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens in der medizinischen Diagnostik kann es sich bei der
15 biologischen Probe z.B. um Blut, Stuhl, Abstriche etc. handeln (z.B. Nachweis von Sepsiserregern in Blut, Nachweis von Protozoen in Blut oder Faeces etc.). Beim Nachweis von Lebensmittelkontaminanten, Pflanzenschädlingen und dergleichen können allgemein tierische oder pflanzliche Gewebe oder Flüssigkeiten, wie z.B.
20 Fleisch oder Fleischsaft, als Probe dienen (z.B. Nachweis von Salmonellen in Fleisch, Nachweis von Pflanzenschädlingen in Saatgut). Ferner kommen Umweltproben wie z.B. Boden- oder Gewässerproben in Betracht. Bei Fischbestandsanalysen oder z.B. zur Artenbestimmung in der Fischzucht und Fischeribiologie kann als
25 biologische Probe etwa auch Fischlaich oder eine Planktonprobe dienen.

Der Fachmann ist in der Lage, die biologischen Proben zum speziesspezifischen Nachweis von Organismen so auszuwählen, daß die
30 Gruppe der Organismen, die in der Probe vorliegen können, begrenzt und wohldefiniert ist. So sind z.B. bei der Abklärung einer Sepsis die für diese Erkrankung verantwortlichen Erreger bekannt, so daß bei der Untersuchung einer Blutprobe der klinische Verdacht auf Sepsis bestätigt werden kann, wenn man durch
35 Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens eines oder mehrere der in Tab. 1 aufgelisteten Bakterien nachweist.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird somit ein Verfahren zum Nachweis von Sepsiserregern zur Verfügung gestellt, bei dem die biologische Probe Blut ist und die Organismen aus der Gruppe bestehend aus *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spec.*, *Proteus spec.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas syringae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi* und *Bacteroides spec.* ausgewählt sind. Vorzugsweise wird das Verfahren durchgeführt, indem man Blut des Patienten in Puffer aufnimmt und die humanen Zellen einer Lyse unterzieht, z.B. unter Verwendung von 1 bis 20 Gew.-% Tween® (Polyoxyethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton® oder 3-[N-(3-Cholanamido-propyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS). Besonders bevorzugt wird das Blut in Lysispuffer durch Vermischen von 1 Volumenanteil Blut mit 4 Volumenanteilen Lysispuffer aufgenommen, wobei der Lysispuffer aus 109,5 g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH 7,5) besteht, man anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Gemisch in einem Zentrifugenröhrchen einer geeigneten Menge einer Kissenflüssigkeit einer Dichte von 1,07 g/ml überschichtet und man bei 1500 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, wodurch man die Bakterien im Pellet erhält (anreichert). Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man eine Kissenflüssigkeit, von der 100 ml aus 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von 1,13 ± 0,005 g/ml und 40,8 ml destilliertem Wasser bestehen.

Das Pellet wird vorzugsweise anschließend zweimal mit 0,15 M NaCl-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen, bei 1500 g pelletiert, und man verdaut das in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM Na₂EDTA) resuspendierte Bakterienpellet nachfolgend für 2 Stunden bei 56°C mit Proteinase K, und man inaktiviert die Proteinase K

im Anschluß bei 95°C für 15 Minuten, wobei man das erhaltene Lysat, das die bakterielle DNA enthält, entweder unmittelbar in einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik einsetzt oder man zuvor eine weitere Aufreinigung durch Verwendung eines z.B. auf Glas-
5 matrix (Glasmilch) basierenden Aufreinigungssystems zum Aufschluß von Bakterien und/oder zur Elimination von Inhibitoren der Amplifikation durchführt.

Bei der Kissenflüssigkeit kann anstelle von Percoll auch Sucrose
10 oder Ficoll eingesetzt werden. Die Dichte des Kissens sollte in jedem Fall bei 1,07 g/ml liegen.

Anschließend wird - wie oben angegeben - eine dem Fachmann allgemein bekannte NAT mit anschließender Kettenabbruchpolymerisation
15 durchgeföhrt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man als Amplifikationsprimer beim Nachweis von Sepsiserregern das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 1 und 2 oder das Primerpaar gemäß
20 SEQ ID NO 3 und 4 aus, wobei das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 1 und 2 besonders bevorzugt ist. Für die Kettenabbruchpolymerisation verwendet man vorzugsweise mindestens einen Sequenzierungsprimer aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 (vgl. auch D.J. Lane in "Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics", John Wiley & Sons 1991, S. 115-175). Beson-
25 ders bevorzugt führt man drei Kettenabbruchpolymerisationen durch, eine Reaktion in Gegenwart der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 5 und 6 (vorzugsweise mit ddA als Terminator), eine Reaktion mit den Primern gemäß SEQ ID NO 7, 8, und 9 (vorzugs-
30 weise mit ddG als Terminator), sowie eine Reaktion in Gegenwart der Primer gemäß SEQ ID NO 10 und 11 (vorzugsweise mit ddA als Terminator).

Als Vorteile des Verfahrens der vorliegenden Erfindung gegenüber
35 der Längenbestimmung von PCR-Fragmenten in einem Agarosegel mit und ohne enzymatischen Restriktionverdau ist insbesondere die

erhöhte Spezifität (Nachweissicherheit) zu nennen. Durch den Einsatz eines internen Primers und dessen Elongation (beim Mini-sequencing, s.o.) ergibt sich eine spezifische Erkennung des PCR-Fragments und damit eine erhöhte Sicherheit im Sinne einer
5 eindeutigen Aussage gegenüber der bloßen Längenbestimmung von PCR-Fragmenten ohne Identitätskontrolle wie z.B. bei Gürtler et al. (vgl. Microbiology 142 (1996) 3-16; WO96/19585).

Für die Durchführung der NAT (z.B. PCR) sowie der Kettenabbruch-
10 polymerisation des erfindungsgemäßen Verfahrens wird etwa die gleiche Zeit benötigt wie für ein herkömmliches Verfahren mit PCR und nachfolgender Enzymbehandlung (vgl. z.B. Gürtler, a.a.O.). Da der Nachweis bzw. die Längenbestimmung der Elongate
jedoch automatisierbar ist (z.B. durch Anwendung der MALDI-TOF-
15 Spektrometrie), kann die finale Analyse im Sekunden- bis Minutenbereich durchgeführt werden. Demgegenüber ist eine herkömmliche Gelanalyse naturgemäß nur schwer automatisierbar und damit außerdem kostenintensiver als die erfindungsgemäß bereitgestellte Lösung.

20 Ferner liegt der besondere Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens darin, daß überraschenderweise ein einfaches und allgemein anwendbares Verfahren zur Verfügung gestellt wird, bei dem ein speziesspezifischer Nachweis von Organismen möglich ist,
25 die - je nach Art der (biologischen) Probe - einer begrenzten, wohldefinierten Gruppe von Prokaryonten oder Eukaryonten angehören.

Das gemäß einem Teilaspekt der vorliegenden Erfindung entwickelte
30 Verfahren zur Isolierung und/oder Anreicherung bakterieller DNA (einschließlich der Aufbereitung bzw. Aufkonzentrierung von Bakterien) kann auch in anderen Anwendungsbereichen als isoliertes Anreicherungsverfahren - insbesondere von biologischen Proben aus der Gruppe bestehend aus Blut oder Blutprodukten,
35 Fleischsaft, Milch, (Ab-)Wasser oder jeder anderen Flüssigkeit, die mit Bakterien belastet sein kann - verwendet werden. Wie

bereits erwähnt, ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß man die biologische Probe gegebenenfalls in Puffer aufnimmt und die nicht-bakterielle Zellen einer Lyse unterzieht, z.B. unter Verwendung von 1 bis 20 Gew.-% Tween[®] (Polyoxyethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton[®] oder 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS). Alternativ kann auch der oben genannte bevorzugte Lysispuffer in denselben oder ähnlichen Volumenanteilen verwendet werden. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wird das Gemisch anschließend in einem Zentrifugenröhrchen einer geeigneten Menge einer Kissenflüssigkeit (s.o.) überschichtet. Bei der weiteren Aufarbeitung einschließlich Proteinase K-Verdau und anschließender Proteinase K-Inaktivierung verfährt man vorzugsweise wie oben am Beispiel der Sepsiserreger angegeben. Das so erhaltene Lysat kann z.B. entweder unmittelbar in einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik eingesetzt werden, gegebenenfalls kann eine weitere Aufreinigung durch Verwendung eines z.B. auf Glasmatrix basierenden Aufreinigungssystems zum Aufschluß von Bakterien und/oder zur Elimination von Inhibitoren der Amplifikation durchgeführt werden.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Anreicherungsverfahrens bestehen darin, daß die Abtrennung einer großen, z.B. aus Blutzellen stammenden DNA-Menge ermöglicht wird. Ferner gelingt in vorteilhafter Weise die Entfernung von z.B. aus Blut stammenden Stoffen (Häm etc.), die die Durchführbarkeit von Nukleinsäureamplifikationstechniken hemmen können.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden ferner Kits zur Durchführung der oben genannten Verfahren zur Verfügung gestellt.

Ein Kit zur Durchführung des Verfahrens zur Aufbereitung und/oder Aufkonzentrierung von Bakterien aus biologischen Proben - insbesondere von Blut oder Blutprodukten, Fleischsaft, Milch, (Ab-)Wasser oder jeder anderen Flüssigkeit, die mit Bakterien belastet sein kann - enthält

a) Lysispuffer enthaltend 1 bis 20 Gew.-% Tween[®] (Polyoxy-
ethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton[®] oder 3-
[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansul-
fonat (CHAPS),

b) Zentrifugenröhrchen,

c) Kissenflüssigkeit einer Dichte von 1,07 g/ml, die ver-
wendet wird, um die biologische Probe darüber zu
schichten.

Besonders bevorzugt besteht der Lysispuffer des Kits aus 109,5
g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton
X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH
7,5).

Die Kissenflüssigkeit des Kits besteht vorzugsweise aus 10 ml
1,5 M NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit
einer Dichte von 1,13 ± 0,005 g/ml, 40,8 ml destilliertem Wasser
(je 100 ml Kissenflüssigkeit).

Die Kits zur Durchführung des Verfahrens zur Isolierung und/oder
Anreicherung bakterieller DNA kann gegebenenfalls weitere Be-
standteile enthalten, die zur (weiteren) Probenaufbereitung
benötigt werden oder zweckmäßig sind. So enthalten die Kits
zusätzlich Bestandteile zum Aufschluß der Bakterien und gegebe-
nenfalls zur DNA-Reinigung (insbesondere zur Elimination von
Inhibitoren der Amplifikation) oder dergleichen, wie z.B. Be-
standteile von auf Glasmatrix basierenden kommerziellen Aufrei-
nigungs-Systemen (z.H. QIAamp DNA Kit). Bevorzugt enthält ein
solcher Kit ferner Proteinase K zum Aufschluß der Bakterien.

Ein Kit zur Durchführung des Verfahrens zum speziesspezifischen
Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten aus biologischen Pro-
ben oder Umweltproben enthält - gegebenenfalls zusätzlich zu den

Bestandteilen eines oben genannten Kits zur Durchführung des DNA-Aufarbeitungs- bzw. Anreicherungsverfahrens - folgende Bestandteile:

- 5 a) Gefäße und Bestandteile zur Durchführung einer NAT, einschließlich der Amplifikationsprimer, wobei die Amplifikationsprimer Sequenzen enthalten, die bei den betreffenden, nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert sind,
- 10 b) Gefäße und Bestandteile zur Durchführung einer oder mehrerer Kettenabbruchpolymerisationen, einschließlich ein oder mehrere (ggf. markierte bzw. unterschiedlich markierte) Sequenzierprimer (vorzugsweise mit einer
- 15 Länge von 15 bis 30 Nukleotiden), der/die mit einem Bereich innerhalb der zu amplifizierenden Sequenzen hybridisiert/hybridisieren, der bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist.
- 20 Der Kit enthält zur Durchführung der Kettenabbruchpolymerisationen entweder 1, 2, oder 3 der vier möglichen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) oder alle vier möglichen dNTPs, wobei ein dNTP durch ein Kettenabbruch-Desoxyribonukleosidtriphosphat (wie z.B. ein ddNTP, 3'-O-Methyl-NTP, 3'-Amino-NTP oder
- 25 dergleichen) ersetzt ist.

Der Kit umfaßt gegebenenfalls ferner Bestandteile zur Bestimmung der Elongatlänge (z.B. zur Durchführung einer Elektrophorese) bzw. entsprechende Bestandteile, die erforderlich oder nützlich

30 sind, um die Proben für entsprechende Verfahren, mit denen die Elongatlänge ermittelt werden kann, vorzubereiten. Solche Bestandteile ergeben sich für den Fachmann aus der obigen Beschreibung des Verfahrens zum speziesspezifischen Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten, auf die in diesem Zusammenhang

35 ausdrücklich Bezug genommen wird.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Kit z.B. um einen Kit zum Nachweis von Prokaryonten, insbesondere von Sepsiserregern, der als Amplifikationsprimer zwei hoch-konservierte Sequenzen aus der rRNA-Region, vorzugsweise die Amplifikationsprimer gemäß SEQ ID NO 1 und 2 oder gemäß SEQ ID NO 3 und 4 (wobei das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 1 und 2 besonders bevorzugt ist), und/oder mindestens einen Sequenzierungsprimer, der mit einem konservierten Bereich der rRNA-Region hybridisiert, vorzugsweise mindestens einen Sequenzierungsprimer aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 (wobei Mischungen bzw. Gemische der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 5 und 6, 7 bis 9 sowie 10 und 11 in einem einzigen oder getrennten Behältern besonders bevorzugt sind) enthält.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Verfahren zur Anreicherung von Mikroorganismen in biologischen Proben:

Im vorliegenden Beispiel wurden Bakterien aus Blut aufbereitet bzw. angereichert. Dazu wurde Blut zunächst in Lysispuffer aufgenommen, der aus 109,5 g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH 7,5) bestand, wobei ein Anteil Blut mit vier Anteilen Lysispuffer (also z.B. 3 ml Blut mit 12 ml Lysispuffer) vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Anschließend wurde das Blut-Lysispuffer-Gemisch auf ein Kissen (5 ml) gegeben und die gesamte Lösung bei 1500 g für 30 Minuten

bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. 100 ml der Kissenflüssigkeit setzten sich wie folgt zusammen: 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von 1,13 g/ml (+/- 0.005 g/ml), 40,8 ml destilliertes Wasser. Statt
5 Percoll kann auch Sucrose oder Ficoll eingesetzt werden. Die Dichte des Kissens sollte in jedem Fall bei 1,07 g/ml liegen.

Das Pellet, in dem sich die Bakterien befanden, wurde zweimal bei RT mit 0,15 M NaCl gewaschen und bei 1500 g pelletiert.

10

Anschließend erfolgte Proteinase K-Verdau des in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM Na₂EDTA) resuspendierten Bakterienpellets bei 56°C für zwei Stunden, und die Proteinase K wurde im Anschluß bei 95°C für 15 Minuten inaktiviert. Das erhaltene
15 Lysat wurde dann in der Amplifikation eingesetzt. Alternativ können auch auf Glasmatrix basierende kommerzielle Aufreinigungs-Systeme (z.H. QIAamp DNA Kit) zum Aufschluß der Bakterien und zur Elimination von Inhibitoren der Amplifikation eingesetzt werden.

20

Beispiel 2

Nachweis von Mikroorganismen durch PCR-gestützte Amplifikation und anschließende Elongation der Amplifikate:

25

Die in Beispiel 1 erhaltene bakterielle DNA wurde einer PCR-Amplifikation unterzogen, und die erhaltenen Amplifikate wurden anschließend in einer Kettenabbruchpolymerisation eingesetzt. Diese Methoden und die Bedingungen, unter denen diese Methoden durchgeführt werden, sind dem Fachmann wohlbekannt (vgl.
30 z.B. Garcia-Pichel et al., Arch. Microbiol. 169 (1998) 469-482; Cha et al., PCR Methods and Application 3 (1993) S18-29 (Manual Supplement); Tracy et al., Bio Techniques 11 (1) (1991) 68-75).

35

A. Nukleinsäure-Amplifikation:

Mit Hilfe der PCR wurde die 16S rRNA-Region mit zwei hochkonservierten Primern amplifiziert. Dazu wurden ein 16S-5'terminaler
5 (SEQ ID NO 1) und ein 16S-3'terminaler Primer (SEQ ID NO 2) kombiniert, wobei einer der beiden PCR-Primer (hier der 16S-5'terminale Primer) ein zur Immobilisierung geeignetes Derivat, z.B. Biotin, enthielt.

10 Anstelle der 16S rRNA kann auch der 16S-23S-rRNA-Spacer amplifiziert werden, gegebenenfalls mit den Primern gemäß SEQ ID NO 3 (16S-proximaler Primer) und SEQ ID NO 4 (23S-proximaler Primer).

Es ist für den Fachmann selbstverständlich, daß durch Modifikation der Oligonukleotide (wobbles, Mismatches, Biotin-, Digoxigenin- oder Fluoresceinmarkierung etc.), das Ergebnis der PCR
15 nicht grundlegend beeinflußt wird.

Die amplifizierten rRNA-Bereiche wurden nachfolgend einer Elongation unterzogen.
20

B. Elongation der Amplifikate

Zur Elongation der amplifizierten Spacer-Sequenzen wurden Oligonukleotide als Sequenzierungsprimer eingesetzt, die universell
25 konserviert sind oder zumindest bei allen Zielorganismen innerhalb der zu erfassenden Gruppe vorhanden sind. Nach Elongation mit einer Polymerase - unter Weglassung eines der vier natürlichen Nukleosidtriphosphate oder in Anwesenheit eines Terminator-
30 Nukleosidtriphosphats (z.B. ddNTP) - entstanden Produkte mit unterschiedlicher, charakteristischer Länge.

Zur Elongation wurden vorliegend jeweils die folgenden Sequenzierungsprimer verwendet, die zu 16S rRNA-Sequenzen komplementär
35 sind, die bei allen Bakterien (Bacteria und Archaea) universell vorkommen (vgl. auch D.J. Lane, a.a.O.):

109r: SEQ ID NO 5 (109r1) und SEQ ID NO 6 (109r2)
685r: SEQ ID NO 7 (685r1), SEQ ID NO 8 (685r2),
SEQ ID NO 9 (685r3).

- 5 Zur Elongation wurden ferner zwei unterschiedlich markierte Sequenzierungsprimer 1475r^s (SEQ ID NO 10) und 1475r^h (SEQ ID NO 11) verwendet.

- 1475r^s ist - innerhalb der Sepsis-Erreger - für die Gruppe der
10 Gram-positiven Kokken spezifisch. 1475r^h ist - innerhalb der Sepsis-Erreger - für die Gruppe *Haemophilus* spezifisch.

- Die entsprechenden 16S rRNA-Sequenzen wurden ausgewählt, da
direkt benachbart sehr divergente Sequenzen vorhanden sind, d.h.
15 Sequenzen, die für eine speziesspezifische Unterscheidung von Mikroorganismen (Bakterien) verwendet werden können.

- Für Sequenzierungsprimer 109r wurden die Nukleosidtriphosphate dGTP, dCTP, dTTP entweder allein oder unter Zusatz von ddATP
20 (wie in in der Tab. 1 angegeben) eingesetzt. Bei Verwendung von dGTP, dCTP und dTTP alleine sind die in Tab. 1 angegebenen Werte um eine Nukleotideinheit zu verringern.

- Für Sequenzierungsprimer 685r wurden die Nukleosidtriphosphate
25 dATP, dCTP, dTTP entweder allein, oder unter Zusatz von ddGTP (wie in in der Tab. 1 angegeben) eingesetzt. Bei Verwendung von dGTP, dCTP und dTTP alleine sind die in Tab. 1 angegebenen Werte um eine Nukleotideinheit zu verringern.

- 30 Für Sequenzierungsprimer 1475r wurden die Nukleosidtriphosphate dGTP, dCTP, dTTP entweder allein oder unter Zusatz von ddATP (wie in in der Tab. 1 angegeben) eingesetzt. Bei Verwendung von dGTP, dCTP und dTTP alleine sind die in Tab. 1 angegebenen Werte um eine Nukleotideinheit zu verringern.

35

Die Elongationsreaktionen wurden unter dem Fachmann allgemein

bekannten Bedingungen durchgeführt (vgl. z.B. Fu et al., a.a.O.).

Die mit den oben genannten Primern erhaltenen Oligonukleotid-
5 Elongate sind nachfolgend in Tab. 1 angegeben.

Im vorliegenden Beispiel wurden die Elongate durch Fluoreszenz-
detektion oder Massenspektrometrie nachgewiesen. Es war eine
eindeutige Differenzierung zwischen *Pseudomonas aeruginosa*
10 (Elongate von 10 und 4 Basen) und *Haemophilus influenzae* (Elongate von 6 und 3 Basen) möglich (s. Tab. 1).

Der zunächst unter Verwendung der Primer 109r und 685r gemäß
Beispiel 2 erhaltene Datensatz ermöglichte keine Unterscheidung
15 zwischen *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*.
Diese ist jedoch unverzichtbar und wurde durch den zusätzlichen
Einsatz des gruppenspezifischen Primers 1475r^s erreicht. Ebenso
war eine Unterscheidung der beiden *Haemophilus* Species durch
Verwendung des Primers 1475r^h möglich (vgl. Tab. 1).

20 Die in Tab. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß bei Verwendung der Sequenz-spezifischen Primer charakteristische Elongate erhalten werden, die eine Differenzierung unterschiedlicher Erreger gestatten.

25 Mit den in Tab. 1 aufgeführten Spezies sind ca. 80 % aller typischer Sepsis-Fälle erfaßt (Geerdes-Fenge et al. (1994) Chemother. J. 3, 131-143). Ein Nachweis der Sepsis ist somit unter Verwendung von nur drei Sequenz-spezifischen Primern, vorzugs-
30 weise 109r, 685r und 1475r, möglich.

Tab. 1: Sequenz-spezifische Oligonukleotid-Elongate innerhalb von 16S rRNA-Regionen

Spezies	Primer 109r ^{a)} , ddA-Terminator Länge des Elongats (Basen)	Primer 685r ^{b)} , ddG-Terminator Länge des Elongats (Basen)	Primer 1475r ^{c)} , ddA-Terminator Länge des Elongats (Basen)
Gram-positive Kokken			
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	5	6 ^s
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	5	5 ^s
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	5	7 ^s
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7	5	62 ^s
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	2	
Gram-negative Kokken			
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	2	
Enterobakterien: Gram-negative Stäbchen			
<i>Escherichia coli</i>	6	5	
<i>Enterobacter spec.</i>	13	5	
<i>Proteus spec.</i>	13	3	
Gram-negative begeißelte Pseudomonaden			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	4	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12	19	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	9	4	
<i>Pseudomonas syringae</i>	13	4	
Pasteurellaceae: Gram-negative unbegeißelte Stäbchen			
<i>Haemophilus influenzae</i>	6	3	5 ^h
<i>Haemophilus ducreyi</i>	6	3	7 ^h
Obligat anaerobe Gram-negative Stäbchen			
<i>Bacteroides spec.</i>	13(14) ^{**}	6	

^{a)}Mischung aus 109r1 und 109r2, ^{b)} Mischung aus 685r1, 685r2 und 685r3, ^{c)} Mischung aus 1475r^s und 1475r^h
 (14)^{**}: Nur ein Isolat in dieser relativ heterogenen Gattung ergibt diese Elongatlänge.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum spezie-spezifischen Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten mit Hilfe von Nukleinsäure-Amplifikations-techniken, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Amplifikation der DNA aus biologischen Proben mit Hilfe einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik,

wobei man einen Bereich der DNA amplifiziert, der durch konservierte Sequenzen begrenzt ist, unter Verwendung von Amplifikationsprimern, die die konservierten Sequenzen enthalten,

- b) Zugabe eines Sequenzierprimers zu den Amplifikaten, der mit einem Bereich innerhalb der amplifizierten Sequenzen hybridisiert, der bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist, wobei der Sequenzierprimer so gewählt ist, daß für die nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongate erhalten werden, wenn man eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt, bei der man 1, 2, oder 3 der vier möglichen dNTPs verwendet oder von den vier möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-NTP ersetzt,

- c) Bestimmung der Länge der erhaltenen Elongate,

wobei man die Prokaryonten oder Eukaryonten dadurch nachweist, daß die erhaltenen Elongate mit den für die jeweiligen Prokaryonten oder Eukaryonten aufgrund ihrer Sequenz zu erwartenden Elongate übereinstimmen,

- d) wobei man gegebenenfalls einen oder mehrere weitere Sequenzierprimer verwendet, der/die mit einem Bereich/Bereichen innerhalb der amplifizierten Sequenzen hybridisiert,

sert/hybridisieren, der/die bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist/konserviert sind,

wobei der/die weitere/weiteren Sequenzierprimer so gewählt ist/sind, daß für die nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongate erhalten werden, wenn man eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt, bei der man 1, 2, oder 3 der vier möglichen dNTPs verwendet oder von den vier möglichen dNTPS eines durch ein Kettenabbruch-NTP ersetzt,

und wobei durch Verwendung des/der weiteren Sequenzierprimers/Sequenzierprimer für die jeweils nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongatmuster erhalten werden,

e) Bestimmung der Länge der erhaltenen Elongate,

wobei man die Prokaryonten oder Eukaryonten dadurch nachweist, daß die bei Verwendung mehrerer Sequenzierprimer erhaltenen Elongatmuster mit den für die jeweiligen Prokaryonten oder Eukaryonten aufgrund ihrer Sequenz zu erwartenden Elongatmustern übereinstimmen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man vor der Amplifikation eine Anreicherung, Aufkonzentrierung und/oder Vermehrung der nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten und/oder eine Isolierung und/oder Anreicherung der DNA vornimmt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Nukleinsäure-Amplifikationstechnik aus der Gruppe bestehend aus PCR, bDNA, LCR, 3SR, SDA oder NASBA ausgewählt ist.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man mehrere Sequenzierprimer verwendet und man bei der Kettenabbruchreaktion von den vier möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-NTP ersetzt, wobei man die Polymerisation in Gegenwart aller Sequenzierprimer durchführt, wobei die Sequenzierprimer jeweils unterschiedliche Markierungen tragen.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der/die Sequenzierprimer eine Länge von 15 bis 30 Nukleotiden aufweist/aufweisen.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Kettenabbruch-NTP Didesoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTP), 3'-O-Methyl-NTP oder 3'-Amino-NTP ist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Länge der Elongate mit Hilfe elektrophoretischer Methoden, durch massenspektrometrischen Nachweis oder durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bestimmt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge der Elongate durch Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight spectrometry (MALDI-TOF-Spektrometrie) bestimmt.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der amplifizierte DNA-Bereich rDNA ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der DNA-Bereich die rRNA-Spacerregion ist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Amplifikationsprimer das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 1 und 2 oder das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 3 und 4 verwendet.

12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt und den/die Sequenzierungsprimer aus der Gruppe bestehend aus Sequenzierungsprimern gemäß SEQ ID NO 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 auswählt.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verfahren zum spezies-spezifischen Nachweis von Eukaryonten ist und der amplifizierte DNA-Bereich das Cytochrom b-Gen aus Mitochondrien ist.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verfahren zum Nachweis von Sepsiserregern ist, bei dem die biologische Probe Blut ist und die Organismen aus der Gruppe bestehend aus *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spec.*, *Proteus spec.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas syringae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi* und *Bacteroides spec.* ausgewählt sind.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man Blut in einer geeigneten Menge Lysispuffer durch Vermischen von 1 Volumenanteil Blut mit 4 Volumenanteilen Lysispuffer aufnimmt, wobei der Lysispuffer aus 109,5 g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH 7,5) besteht, man anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Gemisch in einem Zentrifugenröhrchen einer geeigneten Menge einer Kissenflüssigkeit überschichtet, wobei 100 ml der Kissenflüssigkeit aus 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von $1,13 \pm 0,005$ g/ml, 40,8 ml destillierte Wasser bestehen, und man bei 1500 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, man das Pellet zweimal mit

0,15 M NaCl-Lösung bei Raumtemperatur wäscht, man bei 1500 g pelletiert und man das in TE-Puffer resuspendierte Bakterienpellet nachfolgend für 2 Stunden bei 56°C mit Proteinase K verdaut und man die Proteinase K im Anschluß bei 95°C für 15 Minuten inaktiviert, wobei man das erhaltene Lysat entweder unmittelbar in einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik einsetzt oder man zuvor einer weiteren Aufreinigung durch Verwendung eines auf Glasmatrix basierenden Aufreinigungssystems zum Aufschluß von Bakterien und/oder Elimination von Inhibitoren der Amplifikation durchführt.

16. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verfahren zum Nachweis von Protozoen ist, bei dem die biologische Probe Blut ist und die Eukaryonten aus der Gruppe bestehend aus der Gruppe bestehend aus Flagellaten, Amöben, Sporozoa und Ciliaten ausgewählt sind.
17. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verfahren zum Nachweis von Salmonellen ist, bei dem die biologische Probe Fleisch oder Fleischsaft ist und die Prokaryonten Salmonellen sind.
18. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Probe Fischlaich ist und die Eukaryonten Fische sind.
19. Verwendung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 15 in der medizinischen Diagnostik.
20. Verfahren zur Aufbereitung und/oder Aufkonzentrierung von Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß man eine biologische Probe gegebenenfalls in Puffer aufnimmt und vorhandene nicht-bakterielle Zellen unter Verwendung von 1 bis 20 Gew.-% Tween® (Polyoxyethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton® oder 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) und Inkubation für 5 Minuten bei

Raumtemperatur einer Lyse unterzieht, das Gemisch anschließend in einem Zentrifugenröhrchen einer geeigneten Menge einer Kissenflüssigkeit einer Dichte von 1,07 g/ml überschichtet und man bei 1500 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, wodurch man die Bakterien im Pellet erhält und/oder anreichert.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man das erhaltene Pellet ferner zweimal mit 0,15 M NaCl-Lösung bei Raumtemperatur wäscht und bei 1500 g pelletiert.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Kissenflüssigkeit verwendet, von der 100 ml aus 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von $1,13 \pm 0,005$ g/ml und 40,8 ml destilliertem Wasser bestehen.
23. Verfahren zur Isolierung und/oder Anreicherung bakterieller DNA, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22 durchführt und man die Bakterien im Pellet anschließend einer Lyse unterzieht.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lyse durchführt, indem man das Bakterienpellet in TE-Puffer resuspendierte und für 2 Stunden bei 56°C mit Proteinase K verdaut und man die Proteinase K im Anschluß bei 95°C für 15 Minuten inaktiviert, wodurch man ein Lysat erhält, in dem die bakterielle DNA enthalten ist.
25. Verfahren zum spezies-spezifischen Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten mit Hilfe von Nukleinsäure-Amplifikations-techniken, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst ein Verfahren nach den Ansprüchen 20 bis 24 und anschließend ein Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 14 durchführt.

26. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß es
- a) Lysispuffer enthaltend 1 bis 20 Gew.-% Tween[®] (Polyoxy-ethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton[®] oder 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS),
 - b) Zentrifugenröhrchen, und
 - c) Kissenflüssigkeit einer Dichte von 1,07 g/ml
- enthält.
27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Lysispuffer aus 109,5 g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH 7,5) besteht.
28. Kit nach Anspruch 20 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Kissenflüssigkeit aus 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von 1,13 ± 0,005 g/ml, 40,8 ml destilliertem Wasser (je 100 ml Kissenflüssigkeit) besteht.
29. Kits zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich zu den Bestandteilen eines Kits nach den Ansprüchen 26 bis 28 Bestandteile zum Aufschluß der Bakterien und zur DNA-Reinigung enthält.
30. Kit nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß es Proteinase K enthält.

31. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß es
- a) Gefäße und Bestandteile zur Durchführung einer NAT, einschließlich der Amplifikationsprimer, wobei die Amplifikationsprimer Sequenzen enthalten, die bei den betreffenden, nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert sind,
 - b) Gefäße und Bestandteile zur Durchführung einer oder mehrerer Kettenabbruchpolymerisationen, einschließlich ein oder mehrere (ggf. markierte bzw. unterschiedlich markierte) Sequenzierprimer (vorzugsweise mit einer Länge von 15 bis 30 Nukleotiden), der/die mit einem Bereich innerhalb der zu amplifizierenden Sequenzen hybridisiert/-hybridisieren, der bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist, und
 - c) Bestandteile zur Bestimmung der Elongatlänge
- enthält.
32. Kit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß er zur Durchführung der Kettenabbruchpolymerisationen entweder 1, 2, oder 3 der vier möglichen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) oder alle vier möglichen dNTPs enthält, wobei eines dieser dNTPs durch ein Kettenabbruch-Desoxyribonukleosidtriphosphat ersetzt ist.
33. Kit nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Kettenabbruch-Desoxyribonukleosidtriphosphat ein ddNTP, 3'-O-Methyl-NTP oder 3'-Amino-NTP ist.

34. Kit nach den Ansprüchen 31 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestandteile zur Bestimmung der Elongatlänge Vorrichtungen und Mittel zur Durchführung einer elektrophoretischen Methode, einer massenspektrometrischen Methode oder einer Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie umfassen.
35. Kit den Ansprüchen 31 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich die Bestandteile eines Kits den Ansprüchen 25 bis 29 enthält.
36. Kit nach den Ansprüchen 31 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zum Nachweis von Prokaryonten ist, der als Amplifikationsprimer zwei hoch-konservierte Sequenzen aus der rRNA-Region enthält.
37. Kit nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikationsprimer die Primer gemäß SEQ ID NO 1 und 2 oder die Primer gemäß SEQ ID NO 3 und 4 sind.
38. Kit nach den Ansprüchen 36 und 37, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens einen Sequenzierungsprimer enthält, der mit einem konservierten Bereich der rRNA-Region hybridisiert.
39. Kit nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der/die Sequenzierungsprimer aus der Gruppe bestehend aus Sequenzierungsprimern gemäß SEQ ID NO 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 ausgewählt ist/sind.
40. Kit nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Mischung der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 5 und 6, eine Mischung der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 7 bis 9 sowie eine Mischung der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 10 und 11 in einem einzigen oder getrennten Behältern enthält.

41. Kit nach den Ansprüchen 31 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zum Nachweis von Sepsiserregern ist.

SEQUENZPROTOKOLL

- <110> Krupp Dr., Guido
Scheinert, Peter
Söller Dr., Rainer
Spengler Dr., Ulrich
Artus Gesellschaft für molekularbiologische
Diagnostik und Entwicklung mbH
- <120> Nachweisverfahren für Organismen
- <130> P050133
- <140>
<141>
- <160> 11
- <170> PatentIn Vers. 2.0
- <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
- <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
16S-5'terminaler Primer
- <400> 1
agagtttgat cmtggctcag
20
- <210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
- <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
16S-3'terminaler Primer
- <400> 2
tacggytacc ttgttacgac tt
22
- <210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
- <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 16S-proximaler
Primer



<400> 3
aagtcgtaac aaggtarc
18

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 23S-proximaler
Primer

<400> 4
ggttbccccca ttcrg
15

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 109r1

<400> 5
acgygttack caccggt
17

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 109r2

<400> 6
akrcattact caccggt
17

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 685r1

<400> 7
tctacgratt tcaccyctac



20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 685r2

<400> 8
tctacgcatt tcacygctac
20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 685r3

<400> 9
tctrcgcatt ycaccgctac
20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 1475rs

<400> 10
cccaccttcg acggctag
18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 1475rh

<400> 11
cataccgtgg taaacgcc
18



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 20166 A (DEN BOOM DIRK VAN ; JURINKE CHRISTIAN (DE); HIGGINS G SCOTT (DE); L) 14 May 1998 (1998-05-14) page 1-17	1-9, 12, 13, 15-18
Y	page 73-75; figure 65; example 15	10, 11
X	--- "Nucleic acid techniques in bacterial systematics" 1991, JOHN WILEY AND SONS XP000905166 cited in the application	30-38, 40
Y	Lane D.: "16S/23S rRNA sequencing" pages 115-175 the whole document --- -/--	10, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents:**

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2000

Date of mailing of the international search report

09/05/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05234

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 96 19585 A (HEIDELBERG REPATRIATION HOSPIT :GUERTLER VOLKER (AU)) 27 June 1996 (1996-06-27) cited in the application	30-35. 37.40
Y	the whole document	1-9.12. 13.15-18
Y	WO 96 30545 A (APPLIED GENETICS INC) 3 October 1996 (1996-10-03) the whole document	1-9.12. 13.15-18
X	WO 97 41259 A (LACROIX JEAN MICHEL :HUI MAY (CA): DUNN JAMES M (CA): LEUSHNER JAM) 6 November 1997 (1997-11-06) the whole document	30-34.40
A	EP 0 096 674 A (LKB PRODUKTER AB :NILSSON LENNART (SE): MOLIN ORJAN (SE)) 21 December 1983 (1983-12-21) the whole document	19-29
A	EP 0 745 849 A (BECTON DICKINSON CO) 4 December 1996 (1996-12-04) the whole document	19-29
A	WO 93 23568 A (HOLMES ANN RACHEL :CANNON RICHARD DAVID (NZ): JENKINSON HOWARD FRA) 25 November 1993 (1993-11-25) page 24-26	19-29
A	US 5 885 775 A (HAFF LAWRENCE A ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) the whole document	1-40
A	EP 0 480 289 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15 April 1992 (1992-04-15) the whole document	1-40
A	DE 196 29 166 A (ZTB ZENTRUM TECHNOLOGIETRANSFER) 27 February 1997 (1997-02-27) the whole document	12
E	DE 198 01 661 A (ARTUS GES FUER MOLEKULARBIOLOG) 22 July 1999 (1999-07-22) the whole document	1-9. 11-35. 37.38.40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05234

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9820166	A	14-05-1998	US 5900481 A US 6024925 A AU 5106998 A DE 19782095 T EP 0954612 A NO 992168 A AU 5247298 A DE 19782097 T EP 0937097 A NO 992167 A WO 9820019 A AU 5198098 A DE 19782096 T EP 0937096 A NO 992169 A WO 9820020 A	04-05-1999 15-02-2000 29-05-1998 23-03-2000 10-11-1999 06-07-1999 29-05-1998 14-10-1999 25-08-1999 05-07-1999 14-05-1998 29-05-1998 23-03-2000 25-08-1999 06-07-1999 14-05-1998
WO 9619585	A	27-06-1996	AU 1307595 A	10-07-1996
WO 9630545	A	03-10-1996	AU 5296496 A US 5976798 A	16-10-1996 02-11-1999
WO 9741259	A	06-11-1997	US 5789168 A US 5888736 A US 5830657 A AU 2378097 A AU 2747597 A AU 2816797 A AU 2816897 A CA 2252487 A CA 2252571 A CA 2252588 A WO 9740939 A EP 0896632 A EP 0907752 A EP 0914468 A WO 9741257 A WO 9741258 A US 5897842 A	04-08-1998 30-03-1999 03-11-1998 19-11-1997 19-11-1997 19-11-1997 19-11-1997 06-11-1997 06-11-1997 06-11-1997 06-11-1997 17-02-1999 14-04-1999 12-05-1999 06-11-1997 06-11-1997 27-04-1999
EP 0096674	A	21-12-1983	SE 454278 B DE 3362408 D SE 8203564 A	18-04-1988 10-04-1986 10-12-1983
EP 0745849	A	04-12-1996	AU 4586096 A CA 2170967 A	19-09-1996 11-09-1996
WO 9323568	A	25-11-1993	AU 4094293 A CA 2136206 A EP 0642588 A	13-12-1993 25-11-1993 15-03-1995
US 5885775	A	23-03-1999	EP 0931166 A WO 9814616 A	28-07-1999 09-04-1998
EP 0480289	A	15-04-1992	DE 4038804 A AT 150092 T AT 122104 T AU 655781 B	16-04-1992 15-03-1997 15-05-1995 12-01-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 99/05234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0480289 A		AU 8627591 A	28-04-1992
		CA 2052668 A	10-04-1992
		CA 2093647 A	10-04-1992
		DE 59105402 D	08-06-1995
		DE 59108610 D	17-04-1997
		DK 552203 T	02-10-1995
		WO 9206216 A	16-04-1992
		EP 0552203 A	28-07-1993
		ES 2101706 T	16-07-1997
		ES 2073771 T	16-08-1995
		FI 931586 A	07-04-1993
		IE 68525 B	26-06-1996
		IL 99663 A	31-12-1995
		JP 4258299 A	14-09-1992
		JP 6040839 B	01-06-1994
		JP 2673162 B	05-11-1997
		JP 6501157 T	10-02-1994
		NO 305995 B	30-08-1999
		NZ 240079 A	27-07-1993
		PT 99177 A.B	30-09-1992
		US 5753433 A	19-05-1998
		ZA 9108024 A	29-07-1992
DE 19629166 A	27-02-1997	NONE	
DE 19801661 A	22-07-1999	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 20166 A (DEN BOOM DIRK VAN ; JURINKE CHRISTIAN (DE); HIGGINS G SCOTT (DE); L) 14. Mai 1998 (1998-05-14) Seite 1-17	1-9, 12, 13, 15-18
Y	Seite 73-75; Abbildung 65; Beispiel 15	10, 11
X	"Nucleic acid techniques in bacterial systematics" 1991, JOHN WILEY AND SONS XP000905166 in der Anmeldung erwähnt	30-38, 40
Y	Lane D.: "16S/23S rRNA sequencing" pages 115-175 das ganze Dokument	10, 11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. April 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/05/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05234

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 19585 A (HEIDELBERG REPATRIATION HOSPIT ; GUERTLER VOLKER (AU)) 27. Juni 1996 (1996-06-27) in der Anmeldung erwähnt	30-35, 37,40
Y	das ganze Dokument	1-9,12, 13,15-18
Y	WO 96 30545 A (APPLIED GENETICS INC) 3. Oktober 1996 (1996-10-03) das ganze Dokument	1-9,12, 13,15-18
X	WO 97 41259 A (LACROIX JEAN MICHEL ; HUI MAY (CA); DUNN JAMES M (CA); LEUSHNER JAM) 6. November 1997 (1997-11-06) das ganze Dokument	30-34,40
A	EP 0 096 674 A (LKB PRODUKTER AB ; NILSSON LENNART (SE); MOLIN ORJAN (SE)) 21. Dezember 1983 (1983-12-21) das ganze Dokument	19-29
A	EP 0 745 849 A (BECTON DICKINSON CO) 4. Dezember 1996 (1996-12-04) das ganze Dokument	19-29
A	WO 93 23568 A (HOLMES ANN RACHEL ; CANNON RICHARD DAVID (NZ); JENKINSON HOWARD FRA) 25. November 1993 (1993-11-25) Seite 24-26	19-29
A	US 5 885 775 A (HAFF LAWRENCE A ET AL) 23. März 1999 (1999-03-23) das ganze Dokument	1-40
A	EP 0 480 289 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15. April 1992 (1992-04-15) das ganze Dokument	1-40
A	DE 196 29 166 A (ZTB ZENTRUM TECHNOLOGIETRANSFER) 27. Februar 1997 (1997-02-27) das ganze Dokument	12
E	DE 198 01 661 A (ARTUS GES FUER MOLEKULARBIOLOG) 22. Juli 1999 (1999-07-22) das ganze Dokument	1-9, 11-35, 37,38,40

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05234

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9820166 A	14-05-1998	US 5900481 A US 6024925 A AU 5106998 A DE 19782095 T EP 0954612 A NO 992168 A AU 5247298 A DE 19782097 T EP 0937097 A NO 992167 A WO 9820019 A AU 5198098 A DE 19782096 T EP 0937096 A NO 992169 A WO 9820020 A	04-05-1999 15-02-2000 29-05-1998 23-03-2000 10-11-1999 06-07-1999 29-05-1998 14-10-1999 25-08-1999 05-07-1999 14-05-1998 29-05-1998 23-03-2000 25-08-1999 06-07-1999 14-05-1998
WO 9619585 A	27-06-1996	AU 1307595 A	10-07-1996
WO 9630545 A	03-10-1996	AU 5296496 A US 5976798 A	16-10-1996 02-11-1999
WO 9741259 A	06-11-1997	US 5789168 A US 5888736 A US 5830657 A AU 2378097 A AU 2747597 A AU 2816797 A AU 2816897 A CA 2252487 A CA 2252571 A CA 2252588 A WO 9740939 A EP 0896632 A EP 0907752 A EP 0914468 A WO 9741257 A WO 9741258 A US 5897842 A	04-08-1998 30-03-1999 03-11-1998 19-11-1997 19-11-1997 19-11-1997 19-11-1997 06-11-1997 06-11-1997 06-11-1997 06-11-1997 17-02-1999 14-04-1999 12-05-1999 06-11-1997 06-11-1997 27-04-1999
EP 0096674 A	21-12-1983	SE 454278 B DE 3362408 D SE 8203564 A	18-04-1988 10-04-1986 10-12-1983
EP 0745849 A	04-12-1996	AU 4586096 A CA 2170967 A	19-09-1996 11-09-1996
WO 9323568 A	25-11-1993	AU 4094293 A CA 2136206 A EP 0642588 A	13-12-1993 25-11-1993 15-03-1995
US 5885775 A	23-03-1999	EP 0931166 A WO 9814616 A	28-07-1999 09-04-1998
EP 0480289 A	15-04-1992	DE 4038804 A AT 150092 T AT 122104 T AU 655781 B	16-04-1992 15-03-1997 15-05-1995 12-01-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur Patentfamilie gehören

Interne Aktenzeichen

PCT/EP 99/05234

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0480289 A		AU 8627591 A	28-04-1992
		CA 2052668 A	10-04-1992
		CA 2093647 A	10-04-1992
		DE 59105402 D	08-06-1995
		DE 59108610 D	17-04-1997
		DK 552203 T	02-10-1995
		WO 9206216 A	16-04-1992
		EP 0552203 A	28-07-1993
		ES 2101706 T	16-07-1997
		ES 2073771 T	16-08-1995
		FI 931586 A	07-04-1993
		IE 68525 B	26-06-1996
		IL 99663 A	31-12-1995
		JP 4258299 A	14-09-1992
		JP 6040839 B	01-06-1994
		JP 2673162 B	05-11-1997
		JP 6501157 T	10-02-1994
		NO 305995 B	30-08-1999
		NZ 240079 A	27-07-1993
		PT 99177 A,B	30-09-1992
		US 5753433 A	19-05-1998
		ZA 9108024 A	29-07-1992
DE 19629166 A	27-02-1997	KEINE	
DE 19801661 A	22-07-1999	KEINE	

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P 50133	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/05234	International filing date (<i>day month year</i>) 22 July 1999 (22.07.99)	Priority date (<i>day month year</i>) 22 July 1999 (22.07.1999)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1:68		
Applicant ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 13 February 2001 (13.02.01)	Date of completion of this report 09 October 2001 (09.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05234

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

☐ the international application as originally filed

☒ the description:

pages 1-27 , as originally filed
pages _____ , filed with the demand
pages _____ , filed with the letter of _____

☒ the claims:

pages 1-40 , as originally filed
pages _____ , as amended (together with any statement under Article 19
pages _____ , filed with the demand
pages _____ , filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____ , as originally filed
pages _____ , filed with the demand
pages _____ , filed with the letter of _____

☒ the sequence listing part of the description:

pages 25-27 , as originally filed
pages _____ , filed with the demand
pages _____ , filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☒ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4 ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

5 ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05234

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See annex

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/EP 99/05234

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

Independent Claim 1 and independent Claim 19 do not have any technical features in common. The goals of the methods according to Claims 1 and 19 are also different. Claim 1 relates to a method for species-specific detection and Claim 19 relates to a method for concentrating bacteria. The subject matter of Claims 1 and 19 therefore fails to meet the requirement for unity of invention within the meaning of PCT Rule 13.

The applicant argues that the concentration method according to Claim 19 represents a necessary preparatory treatment of a sample and for this reason is inventively linked to the method according to Claim 1. The Examining Authority does not follow this reasoning because Claims 1 and 19 are individual independent claims that can also be carried out using other preparatory treatments or detection reactions.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/EP 99/05234

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-40	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-40	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-40	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. WO-A-98/20166 (D1) describes a method of DNA diagnosis that is based on the use of mass spectrometric processes. In this method, a specific nucleic acid sequence in the sample is amplified and then brought into contact with a primer that is extended in a reaction with three dNTPs and one ddNTP. The different extended products are evaluated by means of mass spectrometry (see the method described on pages 12-13). The method can be employed by using the differences of known sequences to identify an infection in a biological samples (see pages 73-75).

Claims 1 and 3-7 thus differ from D1 only in that preserved sequences are amplified.

2. WO-A-97/41259 (D2) describes the use of a combined amplification and sequencing reaction for diagnosing an infection in a naturally-occurring biological sample (e.g. *C. trachomatis* in human blood). The use of primers that amplify a preserved region is suggested (page 9, line 21). The sequencing reaction differs from the reaction mentioned in Claim 1 in that the PCR and the chain termination reaction are carried out simultaneously.

3. It would therefore be obvious to a person skilled in the art who had knowledge of D1 and D2 and who wanted to use a sequencing reaction to identify a species, as in D2, to amplify a preserved sequence and to analyze it using the sequencing reaction described in D1. Claim 1 thus does not appear to involve an inventive step. This



applies analogously to dependent Claims 3-7.

The applicant is of the opinion that the use of preserved sequences solves a number of technical problems and is therefore inventive. The problems solved are:

that a surprisingly high number of samples can be examined;

that in addition to specific species, unknown microorganisms can also be detected; and

that a plurality of microorganisms can be detected simultaneously.

The Examining Authority finds that the features necessary to solve these problems are not present in Claim 1. The detection of multiple microorganisms is clearly based on a particular selection of a preserved sequence. The definition of a preserved sequence given in the application only proves that the sequence must have a high degree of homology to the species to be detected. This does not therefore lead to the detection of unknown or multiple microorganisms. As far as the high number of samples is concerned, it is not at all clear how this problem has been solved.

4. However, it emerges from "Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics," p. 115-175, D.J. Lane, (1991), JOHN WILEY AND SONS (D3), that many ribosomal 16S and 23S sequences are known, among them the primer according to SEQ ID NOs 1-2 and 5-9, and are very well suited for the species-specific identification of microorganisms. It would therefore be obvious to a person skilled in the art to employ the ribosomal 16S and 23S sequences as preserved sequences in the method according to D2. The use of primers from the rRNA spacer region in diagnostics is also described in DE-A-198 01 661 (D4). Claims 8-11 and 18 are therefore not inventive.
5. Dependent Claims 2-3, 12 and 14-17 do not appear to include any features that could be regarded as inventive at this time.
6. EP-A-0 096 674 (D5) describes a method for identifying bacteria in blood where



the specimen is incubated for 10 minutes in a reaction solution with 0.1% Triton®X-100; the pretreated sample is then centrifuged for 20 minutes at 400 g and overlaid with a fluid having a density of between 1.02 and 1.14 g/ml. The bacterial band can then be excised and used for further analysis.

7. The method according to Claim 19 differs from D5 only in that a higher concentration of Triton® is used and that greater centrifugal force is used. The use of greater centrifugal force and higher concentrations of a reagent appear to be obvious alternatives for a person skilled in the art and an inventive step could therefore only be recognized for Claim 19 if the applicant were to show in a comparative test that an improved concentration of bacteria is possible with the claimed method. This is particularly necessary because EP-A-0 745 849 (D6) describes that a lysis takes place in the bacteria at concentrations higher than 0.2% Triton® X-100.
8. Dependent Claims 20-23 also do not appear to involve an inventive step at this time.
9. The method according to Claim 24 consists in the combination of the method according to Claim 19 with the method according to Claim 1. However, in the absence of unexpected effects, the combination of two non-inventive methods is not considered inventive.
10. The kit according to Claims 25-29 is not inventive for the same reasons as those of the corresponding method claims.
11. The same applies to the kit according to Claims 30-40.
12. The subject matter of Claims 1-40 is industrially applicable.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05234

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The expression "preserved sequences" used in Claim 1 is vague and is thus not suitable for the definition of the subject matter of a claim. This objection can be read in conjunction with the objection raised in Box 5, point 3.

